

## Características biológicas y diagnóstico inmunológico de un virus de poliedrosis nuclear de *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae)

Jean-Louis Zeddám<sup>1,2</sup> Juana Luna<sup>2</sup> Juan C. Cabrera-La Rosa<sup>2</sup> Zenobio Vargas<sup>2</sup>

### RESUMEN

ZEDDAM J-L, LUNA J, CABRERA-LA ROSA JC, VARGAS Z. 1999. Características biológicas y diagnóstico inmunológico de una poliedrovirus nuclear en *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. per. Ent. 41.- En una larva muerta de *Spodoptera* sp. recolectada en un campo de tomate se encontró un virus de poliedrosis nuclear (VPN). Este virus, denominado SpocNPV, es muy patogénico tanto a *Spodoptera ochrea* (Hampson) como a *S. eridania*. En ambas especies, la producción del virus fue cuantificada en alrededor de  $2-3 \times 10^9$  cuerpos de inclusión (CI)/larva de quinto o sexto estadio. Los bioensayos permitieron establecer que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) fue aproximadamente de  $8.03 \times 10^4$  CI por larva de tercer estadio de *S. eridania*. Se desarrolló una prueba Elisa permitiendo un diagnóstico precoz de las larvas infectadas con VPN. Adaptaciones de esta técnica permitieron detectar cantidades menores de  $2 \times 10^3$  CI. Mediante el análisis Elisa de 2  $\mu$ l de la hemolinfa, el 100 % de las larvas infectadas fueron diagnosticadas positivas cuatro días después de la ingestión del VPN. Simultáneamente, la comparación con las observaciones al microscopio de luz sólo permitieron detectar CI en la hemolinfa de menos del 28 % de estas larvas.

Palabras clave: Baculoviridae, bioensayos,  $DL_{50}$ , especificidad viral, prueba de Elisa, *Spodoptera eridania*, *S. ochrea*, virus de la poliedrosis nuclear.

### SUMMARY

ZEDDAM J-L, LUNA J, CABRERA-LA ROSA JC, VARGAS Z. 1999. Biological features and immunological diagnosis of a nuclear polyhedrovirus of *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. per. Ent. 41.- A dead larva of *Spodoptera* sp. collected from a tomato field was found infected by a nuclear polyhedrovirus (NPV). The virus, named SpocNPV, was very pathogenic to both *S. ochrea* (Hampson) and *S. eridania*. In both species, virus production was quantified to be  $2-3 \times 10^9$  polyhedra (PIB)/larva of fifth and sixth instars. By bio-assays, the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) for *S. eridania* was estimated at approximately  $8.03 \times 10^4$  PIB per third instar larva. An Elisa test was developed for early diagnosis of NPV-infected larvae. Using this technique, we were able to detect as low as  $2 \times 10^3$  PIB. Elisa analysis of hemolymph of infected larvae gave 100 % of positive diagnosis as early as four days after NPV-ingestion. In comparison, light microscopy observations realized simultaneously only permitted to detect PIB in hemolymph of less than 28 % of these larvae.

Key-words: Baculoviridae, bio-assays, Elisa test,  $LD_{50}$ , Nucleopolyhedrovirus, *Spodoptera eridania*, *S. ochrea*, viral specificity.

### Introducción

En el Perú fue aislado un virus de poliedrosis nuclear (VPN) en poblaciones naturales de *Spodoptera* sp. (ZEDDAM *et al.* 1998). Este virus (fig. 1), denominado SpocVPN, demostró ser patogénico tanto a *Spodoptera eridania* (Stoll) como a *S. ochrea* (Hampson) y por ello, repre-

senta un agente promisorio para el control biológico de estas dos importantes plagas. Actualmente, en todo el mundo, se comercializa varios bioplaguicidas en base a VPN patogénicos a distintas especies de Noctuidae (RIBA & SILVY 1989). Estos productos son una buena alternativa al uso excesivo de plaguicidas químicos cuyos efectos colaterales son ahora conocidos (desarrollo de resistencia en la plaga, contaminación del medio ambiente, etc.). Para determinar con precisión los parámetros importantes del sistema hospedero-patógeno, se ha estudiado la patogenicidad del SpocVPN estableciendo la  $DL_{50}$  así como se ha estimado el nivel de producción del virus en larvas de ambas especies de *Spodoptera*. Por otro lado,

<sup>1</sup> IRD, 213 rue La Fayette, 75480 Paris Cedex 10, Francia.

<sup>2</sup> Centro Internacional de la Papa, Apartado 1558, Lima-12, Perú.

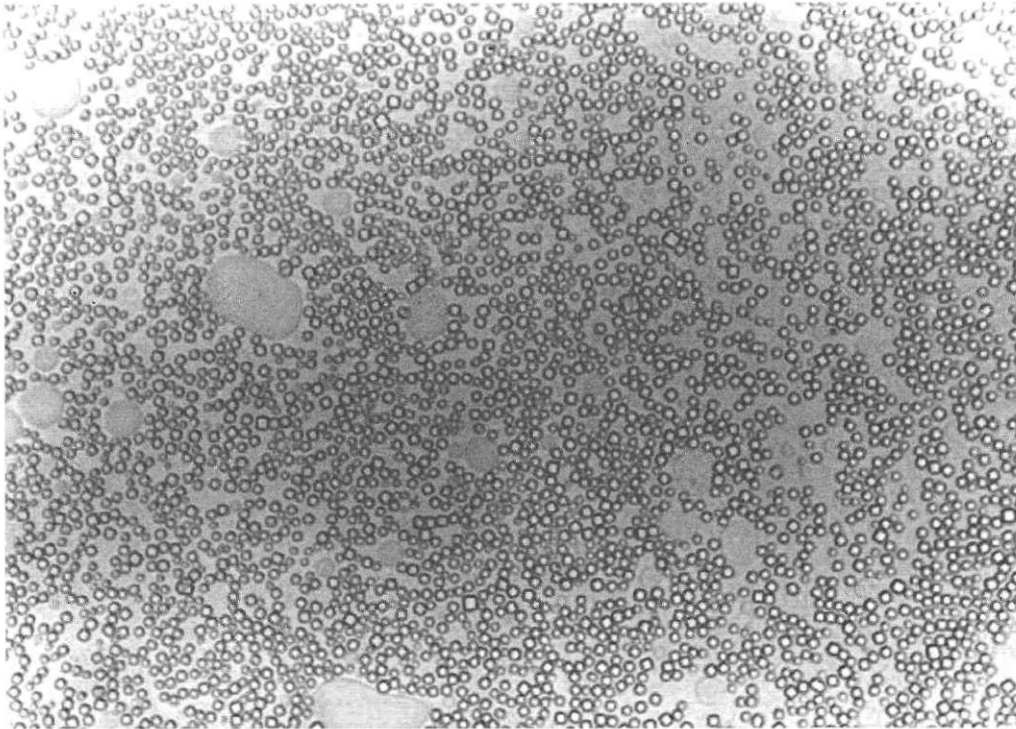


FIGURA 1.- Poliedros del SpocNPV fotografiados con el microscopio electrónico de barrido.

con fines de investigación así como por razones prácticas, se desarrolló un ensayo inmunológico con conjugado enzimático (prueba Elisa) que permite el diagnóstico de la enfermedad en las larvas.

### Material y métodos

#### Crianza del insecto

Se recolectó larvas de *S. eridania* y *S. ochrea* de campos de camote en Vitarte, Lima, y de tomate en Ica, ambas localidades situadas en la costa central del Perú. Después de la emergencia de los adultos y su apareamiento, los huevos puestos fueron desinfectados por inmersión en hipoclorito de sodio al 2%. Las larvas de esta nueva generación fueron utilizadas para el establecimiento de una crianza masal libre de VPN. Las larvas, mantenidas en el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), fueron alimentadas con hojas de *Ricinus communis* L. ("higuerilla").

#### Bioensayos

Para la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se utilizó larvas de tercer estadio de *S. eridania* o *S. ochrea*, colocadas individualmente en frascos de plástico y mantenidas a  $24 \pm 2$  °C. Se infectó 30 individuos con cada una de las siete dosis de virus evaluadas (487 800, 223 100, 162 600, 148 000, 46 200, 41 500 y 21 600 cuerpos de inclusión [CI]/larva, respectivamente). Se les proporcionó a las larvas piezas circulares (5 mm de diámetro) de hoja de camote cuya superficie fue contaminada con una determinada cantidad de CI. Las larvas que no consumieron totalmente el disco de hoja en las 24 h posteriores fueron descartadas. Las demás fueron alimentadas con hojas no tratadas durante los siguientes 17 días. Se registró la mortalidad diariamente. Todas las larvas muertas fueron observadas para determinar la presencia de CI utilizando un microscopio de luz. Para cada experimento, un tratamiento testigo (20 a 30 larvas alimentadas con discos de hoja tratados con agua destilada) fue mantenido en paralelo.

#### Cuantificación de la producción viral en las larvas

Las larvas de *S. eridania* y *S. ochrea* (de quinto y sexto estadio) muertas por la acción del virus fueron recolectadas y pesadas individualmente, y luego homogenizadas en dodecil sulfato de sodio al 0,1 %. La cuantificación de los CI en las suspensiones virales fue realizada utilizando un microscopio de luz y un hematocitómetro (Neubauer).

#### Procedimientos estadísticos

Los datos obtenidos de los bioensayos fueron procesados utilizando el método de análisis probit (FINNEY, 1971) mediante un programa informático desarrollado por el Centro Internacional de Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) y denominado "Analyse de la dose lethale 50; version 3.0" (ANGELES & ALCÁZAR 1996). En este programa, las mortalidades obtenidas en los diferentes tratamientos son corregidas por la fórmula de ABBOT (1925).

#### Producción de antisuero

Se obtuvo el antisuero (AS) contra el SpocVPN por inyección en conejos con CI purificados sobre gradiente de sacarosa (ZEDDAM *et al.* 1998). Se efectuó tres inyecciones intramusculares a intervalos de 10 días. En la primera, el virus fue emulsificado en 1 ml del adyuvante completo de Freund y en las dos siguientes con 1 ml del adyuvante incompleto de Freund. La recolección del AS fue hecha sangrando la oreja del conejo 10 días después de la última inyección del virus.

#### Técnica Elisa

El método indirecto del ensayo inmunológico con conjugado enzimático (Elisa) descrito por CROOK & PAYNE (1980) fue seguido con ligeras modificaciones. En resumen, la adsorción de los antígenos a la superficie de los hoyos de la placa de microtitulación fue obtenida por incubación durante toda la noche (a 4 °C) de diluciones apropiadas de las muestras (suspensiones del virus, homogenizados larvales o hemolinfa de larvas infectadas). Luego, los hoyos fueron llenados con AS (diluido 1/1000 en PBS-Tween) para una incubación de 2 h a 37 °C. En la etapa siguiente, los hoyos fueron llenados con el anti-IgG conjugado a la fosfatasa alcalina (diluido 1/1000 en PBS-Tween) y dejado en incubación por 2 h a 37 °C. Finalmente, fue agregado el sustrato p-nitrofenil fosfato diluido en dietanolamina al 9,7 % (pH 9,8) y se leyó los valores de absorbancia a 405 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro.

Entre las etapas sucesivas, los hoyos fueron vaciados y lavados tres veces con PBS-Tween (0,5 % de Tween 80 en tampón fosfato salino, pH 7,4). Todos los volúmenes fueron de 200 µl.

Para evitar las reacciones cruzadas no específicas con los componentes del hospedero, el AS utilizado para las pruebas fue previamente adsorbido (v/v) frente a un homogenizado de larvas sanas de *S. eridania*.

Dos modificaciones (SHAMIM *et al.* 1994) del método descrito anteriormente fueron además evaluadas por comparación. En la primera, previamente a la cubierta del antígeno, los CI contenidos en las muestras fueron disueltos a 37 °C con carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 1M, pH 10,5). Después de 20 min de incubación en presencia del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, la neutralización del pH de las muestras fue obtenida por adición de HCl (1N). En la segunda modificación, después del paso de cubierta con el antígeno, se agregaron 200 µl de metanol frío (4 °C) en cada hoyo y se dejó en reposo durante 10 min. La combinación de ambas modificaciones (disolución con carbonato más fijación con metanol) también fue evaluada. En estas modificaciones, después de un lavado con PBS-Tween, se siguió los pasos estándar.

## Resultados y discusión

#### Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

Las mortalidades registradas para larvas de tercer estadio de *S. eridania* en relación con las diferentes dosis de virus fueron utilizadas por el programa informático para el cálculo de la regresión lineal (dosis vs. mortalidad) cuya ecuación encontrada fue  $Y = -1,978 + 1,423 X$ . En base a esto, se determinó la DL<sub>50</sub> que fue aproximadamente de 80 225 CI/larva de tercer estadio, variando entre 59 600 a 109 000 CI/larva (tabla 1).

Se observó que los límites fiduciales son amplios pero estos resultados no son atípicos cuando se comparan con datos obtenidos de manera similar por otros autores. Efectivamente, está establecido que la variabilidad dentro de un bioensayo o entre diferentes bioensayos puede ser alta (HUGHES & WOOD 1981). Por ejemplo, BOUCIAS & NORDIN (1977) registraron una diferencia de 10 veces entre el límite superior e inferior de la DL<sub>50</sub> para larvas de cuarto estadio de *Hyphantria cunea*, cuyo valor promedio fue de 2,99 x 10<sup>4</sup> CI/larva. En nuestro estudio, la diferencia entre los valores de los límites de confianza de la DL<sub>50</sub> superior e inferior, es aproximadamente dos veces.

TABLA 1.- Dosis letales significativas calculadas para SpocVPN aplicado sobre larvas de tercer estadio de *Spodoptera eridania*.

Dosis letal	Dosis promedio (CI/larva)	Límite inferior	Límite superior
DL <sub>90</sub>	638 303	363 064	1 122 203
DL <sub>50</sub>	80 225	59 561	108 058
DL <sub>20</sub>	20 550	12 486	33 824

TABLA 2a.- Número de poliedros de SpocVPN encontrados en larvas muertas de *Spodoptera eridania* y *S. ochrea* en relación con su estadio y peso.

Especie	Estadio	Promedio CI/larva	Promedio CI/g de larva
<i>S. eridania</i>	V	1,71 ± 0,38	0,70 ± 0,24
<i>S. ochrea</i>	V	1,88 ± 1,17	0,64 ± 0,33
<i>S. eridania</i>	VI	3,86 ± 3,08	0,88 ± 0,67
<i>S. ochrea</i>	VI	3,25 ± 1,05	0,83 ± 0,33

Los resultados obtenidos para la DL<sub>50</sub> por *S. eridania* son cercanos, aunque superiores, a datos reportados por algunos autores con sistemas análogos (un VPN y su hospedero del género *Spodoptera*). Así, KLEIN & PODOLER (1978), trabajando con el VPN de *Spodoptera littoralis*, encontraron para la DL<sub>50</sub> un valor de 25 800 CI/larva de tercer estadio de *S. littoralis*. Así, se podría considerar que el VPN estudiado es menos virulento, o que *S. eridania* es menos susceptible a la infección viral que los casos en que la DL<sub>50</sub> es menor. Sin embargo, hay que considerar que la DL<sub>50</sub> puede variar de manera significativa en relación con el sustrato usado. Entonces, es posible que nuestros resultados podrían acercarse a promedios menores si se hubiera evaluado con otra especie vegetal como alimento tal como lo indican KEATING *et al.* (1988) quienes registraron que la influencia de la planta hospedera sobre la mortalidad parece estar fuertemente relacionada al pH de los tejidos de la hoja y al contenido en taninos hidrolizables de ésta. Así, encontraron que, para una misma dosis de patógeno, la mortalidad se incrementó cuando la acidez y el contenido en taninos disminuyeron. Igualmente, SANTIAGO-ÁLVAREZ & ORTIZ-GARCÍA (1992) determinaron una DL<sub>50</sub> de 20 483 CI por individuo en un bioensayo realizado sobre larvas de tercer estadio de *S. littoralis*, usando como sustrato frejol mientras que en papa encontra-

ron que la DL<sub>50</sub> para larvas de la misma edad y especie fue de 7 530 CI/larva. Estos autores también encontraron que la DL<sub>50</sub> es directamente proporcional con la preferencia del insecto a una planta determinada. En nuestro caso, el tomate es la planta hospedera principal para *S. eridania* por lo que es probable que la DL<sub>50</sub> bajo estas condiciones sea menor.

Finalmente, una razón por la que la DL<sub>50</sub> determinada es ligeramente más elevada que en otros casos reportados, podría ser porque el SpocVPN evaluado probablemente no sea un VPN de *S. eridania* sino de *S. ochrea* (ZEDDAM *et al.* 1998). Como es en general el caso para los hospederos secundarios (GRANADOS & FEDERICI 1986), *S. eridania* sería entonces menos susceptible al virus que el hospedero de origen.

*Producción del virus*

Los números de CI encontrados en larvas muertas de *S. eridania* y *S. ochrea* por el efecto del SpocVPN son presentados en las tablas 2a y 2b. Las cantidades producidas son muy altas, en general superiores a 10<sup>9</sup> PIB por larva de último estadio (tabla 2a). Las variaciones entre individuos de la misma edad que algunas veces son observadas podrían ser una consecuencia de la variabilidad en la susceptibilidad al virus (algunas larvas mueren antes que otras y así contienen menor cantidad de virus).

TABLA 2b.- Promedios de producción de poliedros para *Spodoptera eridania* y *S. ochrea* y las correspondientes DL<sub>50</sub> equivalentes.

Especie	Estadio	Promedio (CI/larva)	Límites de confianza	Equivalentes-DL <sub>50</sub>
<i>S. eridania</i>	Larva V	2,04 x 10 <sup>9</sup>	1,24x10 <sup>8</sup> - 5,70x10 <sup>10</sup>	25 400
<i>S. eridania</i>	Larva VI	3,05 x 10 <sup>9</sup>	6,40x10 <sup>8</sup> - 1,20x10 <sup>10</sup>	38 000
<i>S. ochrea</i>	Larva V	1,32 x 10 <sup>9</sup>	2,69x10 <sup>8</sup> - 1,20x10 <sup>10</sup>	16 450
<i>S. ochrea</i>	Larva VI	2,40 x 10 <sup>9</sup>	2,25x10 <sup>8</sup> - 1,01x10 <sup>10</sup>	29 900

En general, los contenidos promedios de CI encontrados a la muerte (tabla 2b) no fueron muy diferentes entre *S. ochrea* y *S. eridania*, las dos especies conocidas actualmente como susceptibles a la infección por el SpocVPN. Por otra parte, las comparaciones demostraron que, para ambas especies, la producción del virus fue notoriamente mayor en el sexto estadio que en el quinto. La diferencia fue esencialmente debida a los tamaños respectivos de las larvas de cada grupo. Efectivamente, cuando la producción viral fue expresada como cantidad de CI encontrado por mg de peso del cuerpo, el quinto y sexto estadios parecen producir cantidades comparables de poliedros.

Expresados como equivalentes en DL<sub>50</sub> (Eq-DL<sub>50</sub>), la producción por larva de *S. eridania* se encuentra en el rango entre 20 000 (larvas de quinto estadio) a 48 000 Eq-DL<sub>50</sub> (larvas de sexto estadio) demostrando así el alto nivel de multiplicación del patógeno en el insecto. Aunque parezca más susceptible al virus, *S. ochrea* no es un hospedero ventajoso en cuanto a la producción del SpocNPV con respecto a *S. eridania*. Así, estos resultados demuestran el gran potencial de uso de una u otra especie como hospederos para producir el virus que podría ser necesario en el futuro para el control biológico.

#### Prueba Elisa

##### a. Suspensión purificada de poliedros

El límite de detección de la prueba estándar fue de casi 4 x 10<sup>6</sup> CI/ml (es decir 8 x 10<sup>9</sup> CI/hoyo). Al agregar metanol como se describió anteriormente, las absorbancias fueron mayores para una misma concentración viral y así la sensibilidad se incrementó (al menos 25 veces). Estos resultados están en concordancia con los trabajos hechos por SHAMIM *et al.* (1994). El metanol probablemente permite una mejor fijación de los CI a los hoyos, lo que reduce las pérdidas que se presentan durante el proceso de lavado.

##### b. Homogenizados de larvas infectadas con VPN

Aplicando la prueba de Elisa estándar a homogenizados de larvas muertas por el virus se detectó la presencia del VPN hasta la dilución de 4 x 10<sup>4</sup> (correspondiente a aproximadamente 80 µg de tejido larval/ 200 µl). Cuando se utilizó carbonato de sodio, el límite de detección alcanzó al menos la dilución 10<sup>4</sup>. Estos resultados concuerdan con los registrados por CROOK & PAYNE (1980), quienes demostraron que la detección del virus de la granulosis fue claramente favorecida por la disolución de sus cápsulas con el carbonato. Los cuerpos de inclusión en disolución permiten liberar muchas moléculas de poliedrina (que no fueron previamente accesibles al AS) y así incrementar el número de lugares antigénicos potencialmente expuestos al reconocimiento por el AS.

Cuando la disolución en carbonato fue combinada con la fijación en metanol, la prueba de Elisa dio una reacción positiva al menos por encima de la dilución 10<sup>7</sup>, incrementando drásticamente la sensibilidad del método (por ejemplo fue posible diagnosticar la presencia de VPN utilizando sólo 20 ng de larva infectada por el virus/200 µl).

Los resultados obtenidos pueden variar ligeramente de acuerdo al nivel de infección de larvas individuales pero dan una buena idea de la sensibilidad del método estándar y del incremento en la sensibilidad debido a las modificaciones.

Para analizar la precocidad de la prueba en la detección de la presencia de una infección viral, las larvas previamente contaminadas con SpocVPN fueron evaluadas individualmente. Para ésto, se recolectó 2 ml de hemolinfa de cada individuo punzando cuidadosamente el cuerpo en diferentes momentos después de la infección. De 23 larvas evaluadas, todas murieron finalmente debido a la virosis.

Los resultados demostraron que el SpocVPN puede ser detectado precozmente, utilizando la prueba de Elisa en un estado de

la enfermedad en que los PIB no pueden ser todavía observados al microscopio de luz (si los PIB no están presentes en la hemolinfa, o si están presentes pero en tan bajas cantidades que no pueden ser visualizados). Estos datos coinciden con los obtenidos por KELLY *et al.* (1978) con los homogenizados completos de larvas de *Heliothis armigera* infectadas por su propio VPN. Más aún, con el método empleado, es innecesario matar las larvas, lo que permite seguir el desarrollo de la enfermedad y llevar a cabo diferentes tipos de estudios de laboratorio.

Desde el punto de vista práctico, es interesante poder diagnosticar el desarrollo de la enfermedad en la población plaga algunos días antes de la aparición de los síntomas macroscópicos asociados con la virosis y de la consecuente mortalidad. Por lo que, de acuerdo a la evolución de la enfermedad en la población del hospedero —que se puede determinar con esta prueba— se podría adaptar las estrategias de control de la plaga después de una primera aplicación de virus (por ejemplo, decidiendo si es necesario repetir una aplicación de virus o usar otros productos).

### Conclusiones

Bajo condiciones de laboratorio, el SpocVPN es muy patogénico tanto a *S. eridania* como a *S. ochrea*, por lo que parece ser una buena alternativa a ser utilizada en el control biológico de estas plagas. Para confirmar los resultados de los ensayos de laboratorio, se está desarrollando trabajos de campo para evaluar la eficiencia del SpocVPN en el control de *S. eridania* mediante aplicaciones de suspensiones acuosas del virus.

Por los resultados obtenidos, las dos especies parecen ser hospederos adecuados para la producción masal del SpocVPN. En efecto, a pesar de la especial precaución que debe tenerse para limitar el canibalismo, *S. eridania* y *S. ochrea* son fáciles de criar y de infectar con el virus (a través de la contaminación del alimento). El tamaño relativamente grande de sus larvas nos permitió obtener cantidades apreciables del virus, ya que cada larva produjo suficiente patógeno para provocar potencialmente la muerte de varios cientos de individuos. Además, debido a su polifagia, el desarrollo de una dieta artificial no debería ser difícil de conseguir, facilitando la mecanización y el proceso de producción del virus a gran escala.

**Agradecimientos.**— Los autores agradecen al Dr. Fausto Cisneros Vera por la revisión del manuscrito y al Biólogo Octavio Zegarra Aliaga por su colaboración en el uso del microscopio electrónico.

### Literatura

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Ent.* 18: 265-267.
- Angeles I, Alcázar J. 1996. Susceptibilidad de la polilla *Phthorimaca operculella* al virus PoGV. *Rev. per. Ent.* 38: 71-76.
- Boucias DG, Nordin GL. 1977. Interinstar susceptibility of the fall webworm, *Hyphantria cunea* to its nucleopolyhedrosis and granulosis viruses. *J. Invert. Pathol.* 30: 68-75.
- Crook NE, Payne CC. 1980. Comparison of three methods of Elisa for Baculoviruses. *J. gen. Virol.* 46: 29-37.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis. Cambridge, Cambridge University Press.
- Granados RR, Federici BA. 1986. The biology of Baculoviruses. Vol 1. Biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC Press, Inc. 275 pp.
- Hughes PR, Wood HA. 1981. A synchronous peroral technique for the bio-assay of insect viruses. *J. Invert. Pathol.* 37: 154-159.
- Keating ST, Yendol WG, Schultz, JC. 1988. Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lep.: Lymantriidae) to a baculovirus and host plant foliage constituents. *Environ. Ent.* 17: 952-958.
- Kelly DC, Edwards ML, Evans HF, Robertson JS. 1978. The use of enzyme linked immunosorbent assay to detect a nuclear polyhedrosis virus in *Heliothis armigera* larvae. *J. gen. Virol.* 40: 465-469.
- Klein M, Podoler H. 1978. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. *J. Invert. Pathol.* 32: 244-248.
- Riba G, Silvy C. 1989. Combattre les ravageurs des cultures: enjeux et perspectives. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique. 230 pp.
- Shamim, M., Baig M, Datta, RK, Gupta SK. 1994. Development of monoclonal antibody-based sandwich Elisa for the detection of nuclear polyhedra of nuclear polyhedrosis virus infection in *Bombyx mori* L. *J. Invert. Pathol.* 63:151-156.
- Santiago-Alvarez C, Ortiz-García R, 1992. The influence of host plant on the susceptibility of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae) larvae to *Spodoptera littoralis* NPV (Baculoviridae, Baculovirus). *J. appl. Ent.* 114: 124-130.
- Zeddám J-L, Luna J, Cabrera J, Vargas Z, Gómez H. 1998. Aislamiento y caracterización de un virus de poliedrosis nuclear patogénico a *Spodoptera eridania* (Lep., Noctuidae). *Rev. per. Ent.* 40: 63-70.